Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. M. Eggstein

Adsorption von Insulin an Zellulose in Abwesenheit und in Gegenwart von Serumproteinen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Eberhard Egner
aus Stuttgart

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536516_0060

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. M. Eggstein

Adsorption von Insulin an Zellulose in Abwesenheit und in Gegenwart von Serumproteinen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Eberhard Egner
aus Stuttgart

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. Dr. N. Schwenzer

Berichterstatter: Professor Dr. E. Kallee
(Professor Dr. W. Dölle)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Allgemeines zum experimentellen Teil	2
2.1.	Vorgehen	2
2.2.	Insulinbindung an Glas	3
2.3.	Reinigung der Geräte	4
2.4.	Anmerkung zu den Verdünnungsreihen	4
2.5.	Verzeichnis der Abkürzungen	5
3.	Materialien	5
4.	Methoden im äquilibrierten System	8
4.1.	Gleichgewichtsbestimmung	8
4.2.	Vorgehen bei kleinen Zellulosemengen ...	9
4.2.1.	Verwendung von mit Milchzucker tablettierter Zellulose	9
4.2.2.	Aufschwemmungen von Zellulosepulver ..	10
5.	Vorversuche im äquilibrierten System	11
5.1.	Versuche zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit	15
5.2.	Einfluß der Insulinkonzentration auf die Bindung an Zellulose	17
5.3.	Einfluß der Eiweißkonzentration auf die Bindung von Insulin an Zellulose	17
5.4.	Einfluß der Reinheit der verwendeten Insuline auf die Adsorption an Zellulose .	19
5.5.	Ergebnisse der Vorversuche im äquilibrierten System	21
6.	Adsorptionschromatographie	22
6.1.	Methodik der chromatographischen Versuche	23
6.2.	Zusammenfassung der chromatographischen Ergebnisse	31

Seite

7. Hauptversuch: Gleichgewicht zwischen freiem und zellulosegebundenem Insulin .. 32

7.1. Bestimmung der Adsorptionsisothermen für an Zellulose adsorbiertes Insulin . 32

7.1.1. Begriffsbestimmung 32

7.1.2. Adsorptionsgleichgewicht 33

7.1.3. Vorgehen 34

7.1.4. Ergebnisse 35

7.1.5. Mathematisch-statistische Auswertung und Diskussion der gewonnenen Abhängigkeiten 38

7.1.5.1. Die FREUNDLICHsche Adsorptionsisotherme 38

7.1.5.2. Die LANGMUIRsche Adsorptionsisotherme 39

7.1.5.3. Fehlerabschätzung 42

1. Fehler der Einzelwerte c/k 42

2. Zählstatistische Fehler der Messungen und ihre Fortpflanzung .. 42

3. Fehler durch nicht adsorbierbares Insulin und freie Radioaktivität 44

4. Berechnung des maximalen Adsorptionsgrades 47

7.2. Abhängigkeit der Insulinbindung von der Eiweißkonzentration 48

7.3. Einfluß der Menge des Adsorbens auf die Insulinbindung 50

8. Diskussion 50

9. Zusammenfassung 57

Literaturverzeichnis 59

1. Einleitung

Großmolekulare Stoffe neigen zur Anlagerung an Oberflächen. Für die Proteine wurde die Adsorption an Zellulose erstmals von TISELIUS (1949) zunächst als störender Effekt bei der Papierchromatographie von Eiweißlösungen angegeben. Bald wurde die reversible Bindung von Proteinen und überhaupt von chromatographisch zu trennenden Substanzen an Adsorbentien als einer der wesentlichen Vorgänge bei den meisten chromatographischen Verfahren erkannt (CRAMER, 1953; TURBA, 1954).

Im Gegensatz zur Bindung von Antigenen an Antikörper bindet Papier bei höheren Proteinkonzentrationen nahezu alle Proteine unterschiedslos (KALLEE, 1952, 1954). Unterhalb einer kritischen Eiweißkonzentration dagegen ließ sich ein Selektionsphänomen feststellen, das verschiedene Proteine zu unterscheiden gestattete. Diese Beobachtung wurde erstmals annähernd gleichzeitig von PETERS et al. (1956) und BERSON et al. (1956) bestätigt.

BERSON u. YALOW (1959) und KERP et al. (1966) benutzten Zellulose zur Trennung freien und antikörpergebundenen Insulins im Radioimmunoassay. Quantitative Angaben über die Bindung von markiertem Insulin an Zellulose finden sich bei KALLEE (1952, 1954) und MÜLLER (1969) aufgrund papierelektrophoretischer Untersuchungen und bei KERP et al. (1966). KERPs Angaben erstrecken sich über einen Konzentrationsbereich von 0,2 bis $2{,}0 \cdot 10^{-8}$ Mol Insulin/l in Aufschwemmungen von Zellulosepulver.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Bindungsvermögen von Zellulosepulver für Insulin innerhalb eines großen Konzentrationsspektrums in Abwesenheit und in Gegenwart von Serumproteinen zu bestimmen.

2. Allgemeines zum experimentellen Teil

2.1. Vorgehen

Die Bindung von Insulin an Zellulose wurde mittels zweier Versuchsanordnungen quantitativ bestimmt:

1. Das Verhältnis von gelöstem und zellulosegebundenem Insulin ließ sich in einem geschlossenen System aus Aufschwemmungen von Zellulosepulver in Insulinlösungen ermitteln.
2. In einer weiteren Versuchsreihe wurden Insulinlösungen der Säulenchromatographie unterworfen.

Zur Bestimmung der Mengenverhältnisse gelösten und zellulosegebundenen Insulins wurden die Insulinlösungen mit ^{131}J-markiertem Insulin in Spuren versetzt. Wie KERP et al. (1966) und KALLEE (1952, 1967, 1969) nachgewiesen haben, verhalten sich spurenjodiertes und nichtmarkiertes Insulin gegenüber Zellulose und Serumeiweißen nicht nachweisbar verschieden. Die Verteilung der Radioaktivität zwischen Lösung und Zellulose ist also ein Maß für die Verteilung des Insulins. Die Radioaktivität der Proben wurde mit einem Szintillationsbohrlochkristall gemessen, der über einen Einkanalimpulshöhenanalysator (FH 62, Frieseke & Hoepfner) an ein Strahlungs-

meßgerät (FH 469 derselben Firma) angeschlossen war. Die Mengen an Tracer-Insulin wurden so bemessen, daß die Zählraten nach Möglichkeit 10 000 Impulse pro Minute überstiegen, sonst wurde die Meßdauer entsprechend verlängert.

2.2. Insulinbindung an Glas

Störungen des Gleichgewichtes sind durch die Bindung von Insulin an die Oberfläche der gläsernen Meß- und Reaktionsgefäße zu erwarten. Der Effekt, der zuerst von FERREBEE et al. (1951) und von NEWERLY und BERSON (1957) beschrieben wurde, macht sich besonders bei kleinen Volumina und geringen Insulinkonzentrationen bemerkbar. Nach den Angaben von HILL (1959) kann der Insulinverlust bis zu 33% an Pyrexglas, silikoniertes Glas und Polyäthylen betragen und durch Zusatz von 5% Gelatine zu den Insulinlösungen vermieden werden. Die Adsorptionsfähigkeit an Glas ist nicht auf Insulin beschränkt. Vielmehr verhält sich Albumin ebenso (REED u. ROSSALL, 1958).

WISEMAN jr. u. BALTZ (1961) drängen die störende Insulinadsorption an Glas durch Zusatz von 0,5 mg Humanserumalbumin pro ml Insulinlösung zurück. Nach SÖNKSEN et al. (1965) verhindert zwar auch ein Gehalt von 2 mg Albumin pro ml Insulinlösung die Adsorption des Insulins an Glasoberflächen nicht vollständig, Albumin sei aber wirksamer als die Gelatine. Ein von dieser Arbeitsgruppe beobachteter unterschiedlicher Einfluß von Gelatine und Albumin auf Bio- und Immunoassay des Insulins kann in der vorliegenden Arbeit unberücksichtigt bleiben.

KERP et al. (1966) stellen fest, ein Gehalt von 0,25% an Humanserumalbumin verhindere eine störende Adsorption von Insulin an Glas völlig. Allerdings wird sich wohl selbst ein geringer Eiweißzusatz auch auf die Bindung des Insulins an Zellulose auswirken. In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Gebrauchslösungen mit einem Gehalt von 0,25% Humanserumalbumin (HSA) bereitet.

2.3. Reinigung der Geräte

Zur Befreiung der Glassinterplatten, der Nutschen und Chromatographiesäulen von Zelluloserückständen mußte auf Chromschwefelsäure trotz ihrer großen Reinigungskraft verzichtet werden. Nach LAUG (1934) werden nämlich in Chromschwefelsäure vorhandene oder gebildete Chrom-III-Verbindungen von Glasoberflächen adsorbiert und können bei weiterem Gebrauch wieder abgegeben werden. Schwermetallionen können mit den Schwefelgruppen des Insulinmoleküls reagieren und zu Fällungen des Insulins führen. Nach einer Empfehlung der Fa. Schott und Gen., Mainz, wurde Chromschwefelsäure durch Kaliumperchloratschwefelsäure ersetzt.

2.4. Anmerkung zu den Verdünnungsreihen

Der arithmetische Maßstab empfiehlt sich, um innerhalb gegebener Grenzen möglichst eng abgestufte Werte zu bekommen. Um mit wenigen Ansätzen einen Überblick über einen großen Konzentrationsbereich zu gewinnen, ist es günstiger, die Insulinlösungen in logarithmischen Reihen zu verdünnen.

2.5. Verzeichnis der Abkürzungen

HS Humanserum
HSA Humanserumalbumin
HSAP Phosphatpuffer 0,04 mol, pH 7,4 mit 0,25% HSA
I Insulin
RI Rinderinsulin
SwI Schweineinsulin
EW Eiweiß
Z Zellulose

3. Materialien

Zellulosepulver MN 300 HR, Macherey - Nagel & Co., Düren

Das Pulver wurde zunächst in Anlehnung an eine Empfehlung der Farbwerke HOECHST nachgereinigt. 100 g Zellulose wurden mit 2 l destilliertem Wasser 2 Stunden gerührt. Nach kurzem Absitzen der Zellulose Abgießen des trüben Überstands. Mit 2 l Äthanol weitere 3 Stunden Rühren. Nach Absitzen der Zellulose und Dekantieren des Überstandes Entfernen des Alkohols mit 5 mal 2 l destilliertem Wasser und jeweils kurzem Rühren. Abgießen des trüben Überstands und Absaugen der Zellulose auf einem Büchnertrichter. Herausstechen der Masse und Trocknen an der Luft. Schließlich vorsichtiges Pulvern des Präparats in der Reibschale. Dieser Arbeitsgang sollte entfetten und vor allem die feinen, schluffartigen Teilchen entfernen, die sich nur schwer sedimentieren lassen.

Zellulose-Tabletten

500, 100, 50, 10 oder 5 µg Zellulose MN 300 HR mit Milchzucker zu einem Gesamtgewicht von 50 mg tablettiert.

Trägerinsulin

Rinder- und Schweineinsulin-Stammlösungen (300 µg/ml). 1 mg RI und SwI = 1,74 · 10^{-7} Mol= ca. 25 - 28 E.

60 mg 3 mal umkristallisiertes Rinder- und Schweineinsulin (HOECHST) wurde jeweils in der angegebenen Reihenfolge versetzt mit:

- 5ml 1/100 n HCl und bis zur Auflösung geschüttelt,
- 100 ml 0,25% HSA enthaltendem 0,04 mol Phosphatpuffer nach SØRENSEN pH 7,4,
- 5 ml 1/100 n NaOH unter gutem Schütteln und
- HSA-Pufferlösung zu 200 ml.

Portionen zu 10 ml wurden eingefroren und bei -20°C gelagert.

^{131}J-markiertes Rinderinsulin (HOECHST)

Die spezifische Aktivität der Präparate betrug je nach verwendeter Charge zwischen 8,9 und 12,9 mCi ^{131}J/mg Insulin, die Insulinkonzentration zwischen 0,029 und 0,0388 mg/ml. Vor Gebrauch wurden der Originallösung so viel 15% Humanserumalbuminlösung zugesetzt, daß sie 0,25% HSA enthielt.

^{131}J-markiertes Schweineinsulin (HOECHST)

Dem Schweineinsulin war bereits vom Hersteller 0,5% Rinderalbumin zugesetzt worden. Die spezifische Aktivität der verwendeten Chargen lag zwischen 127 und 180 mCi ^{131}J/mg Insulin, die Insulinkonzentration zwischen 0,262 und 0,397 µg/ml.

Die einzelnen Chargen radioaktiv markierten Insulins wurden nur während der 1. Woche nach ihrer Herstellung verwandt. Alle notwenidgen Verdünnungen wurden mit 0,25% HSA enthaltender Pufferlösung hergestellt.

Menschliches Blutserum wurde aus Aderlässen durch Abschleudern des Blutkuchens nach Spontangerinnung gewonnen. Hämolytische Seren wurden verworfen. Portionen zu 10 ml wurden eingefroren und bei -20°C gelagert. Alle Versuchsreihen wurden jeweils mit dem Serum desselben Spenders durchgeführt.

Eine Probe jeder Serumcharge wurde mit dem Standardansatz der Routinebestimmung des Labors auf Insulinantikörper (Agarzonenelektrophorese; KALLEE, 1967) untersucht. Keines der verwendeten Seren wies einen erhöhten Antikörperspiegel auf.

Humanalbumin, trocken, "reinst", elektrophoretischer Reinheitsgrad 100%, (BEHRING, Marburg) Op.Nr. 2936.

Pufferlösung (HSA-P)

0,04 m Phosphatpuffer nach SØRENSEN pH 7,4 wurde mit einem Zusatz von 0,25% Humanalbumin verwendet.

4. Methodik im äquilibrierten System (Batch-Technik)

4.1. Gleichgewichtsbestimmung

Für alle Bindungsversuche wurde grundsätzlich 1 ml Lösung eingesetzt. Als Reaktionsgefäße dienten 15 ml fassende, zylindrische, graduierte Zentrifugengläser mit halbkugelförmigem Boden. Die Röhrchen sind maschinell hergestellt und in Abmessungen und Gewicht weitgehend konstant. Die äußeren Maße sind 115 x 12 mm, die lichte Weite beträgt 13 mm. Stärker im Gesamtgewicht aus der Reihe fallende Gläser wurden beim Tarieren vor der Zelluloseeinwaage ausgeschieden. Eine hinreichend gleichmäßige Meßgeometrie war somit gewährleistet.

Versuchsablauf

1. In eine Reihe trockener Gläschen (1) wurde Zellulosepulver in Mengen zwischen 10 und 100 mg eingewogen. Dazu kam nach KERP et al. (1966) 55 μl albuminfreier Puffer pro 100 mg Zellulose als Hydratwasser. Dieses wird von der Zellulose aufgenommen und tritt später nicht im Volumen des wäßrigen Suspendierungsmittels auf.
2. Einpipettieren von 1 ml Insulinlösung, die 0,25% Humanserumalbumin enthielt und mit 0,04 m Phosphat nach SØRENSEN auf pH 7,4 gepuffert war. Dann wurden die Gläser zur Suspendierung der Zellulose zunächst kurz von Hand bei Zimmertemperatur und dann 1 Stunde auf dem Rüttler bei 4°C geschüttelt.

3. Nach Ablauf der Reaktionszeit bei 4°C wurden die Ansätze 10 min. bei 3000 $\bar{g}$ zentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit wurde aus Glas (1) die Hälfte, 500 μl, in ein leeres Glas (2) abpipettiert.

4. Nach Auffüllen der Volumina in beiden Gläsern auf 1 ml wurde deren Radioaktivität N_1 bzw. N_2 bestimmt. Die Summe der Impulsraten $N_1 + N_2$ entspricht dem Gesamtinsulin, $2 \times N_2$ der in Lösung befindlichen und die Differenz $N_1 - N_2$ der an Zellulose gebundenen Insulinmenge.

4.2. Vorgehen bei kleinen Zellulosemengen

Das Abteilen von Zellulosemengen unter 10 mg Gewicht wurde statt durch Wägung auf zweierlei Weise vorgenommen:

4.2.1. Verwendung von mit Milchzucker tablettierter Zellulose

Es wurden Tabletten zu 50 mg verwendet, die aus Milchzucker bestehen und 5, 10, 50, 100 und 500 μg Zellulosepulver enthalten. Mit der insulinhaltigen Lösung übergossen zerfielen sie unter leichtem Umschütteln rasch, wobei sich der Milchzucker auflöste. Die Zellulosesuspension wurde dann genauso weiter behandelt wie in Abschnitt 4.1. beschrieben.

Nach dem Niederzentrifugieren der Zellulose haftete das Sediment allerdings nur schlecht am Gefäßboden. Beim Abheben des halben Überstandes mit einer Pipette wurde deshalb leicht Zellulose aufge-

wirbelt und mit angesaugt, was zu Fehlbestimmungen der Gleichgewichtslage führte. Besonders deutlich und störend zeigte sich dieser Effekt bei den hochprozentigen Serumlösungen; er beruht wohl auf einer Erhöhung des spezifischen Gewichts der Flüssigkeiten. Durch Verwendung von Glasfilternutschen oder von Filterbechern könnten diese Schwierigkeiten durch vorheriges Auswaschen des Milchzuckers mit Wasser vermieden werden.

Da nicht sicher auszuschließen ist, daß die Bindungseigenschaften der Zellulose durch die hohen Drucke beim Tablettieren verändert werden, wurden in dieser Richtung keine weiteren Versuche unternommen.

4.2.2. Aufschwemmungen von Zellulosepulver

In Phosphatpuffer durch ständiges Rühren in Suspension gehaltenes Zellulosepulver wurde durch Pipettieren genau abgeteilt. Als Reaktionsgefäße dienten hier Glasfilternutschen mit 2 ml Inhalt (SCHOTT, Mainz, Nr. 258575, Porosität 4).

Versuchsablauf

1. Ein der gewünschten Zellulosemenge entsprechendes Volumen der auf dem Magnetrührer ständig gerührten Zellulosesuspension in HSAP wurde mit einer Meßpipette in die Nutsche gegeben und die Flüssigkeit auf einer Saugflasche abgezogen.
2. Dann wurde der Auslauf der Nutsche mittels Schlauch und Quetschhahn verschlossen und die Insulinlösung einpipettiert. Eine Zugabe von

Hydratwasser entfiel. Sofort nach Zugabe des Reaktionsgemisches wurde von unten mittels einer Kolbenspritze Luft durch die Nutsche geblasen und dann der Quetschhahn geschlossen. Die Zellulose wurde dabei aufgewirbelt, der unter der Platte verbleibende geringe Überdruck verhinderte das Durchfließen der Lösung.

3. Die Nutsche wurde mit Parafilm® verschlossen und ebenso wie die übrigen Ansätze geschüttelt und inkubiert.

4. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Nutsche auf einen Saugfinger gesetzt und die Insulinlösung in ein Zentrifugenglas abgesaugt. Die an der Mündung des Trichterstiels verbleibende Flüssigkeit wurde nach kurzem Ablaufenlassen mit einem Filterpapierstreifen aufgenommen, der dann in das zur Messung dienende Zentrifugenglas geworfen wurde. Die Nutsche wurde ebenfalls in ein zur Radioaktivitätsmessung geeignetes Glas gebracht.

   Das zu messende radioaktive Insulin auf der Filterplatte befand sich dabei innerhalb des geometrischen Optimums des Bohrlochkristalls.

   Das Vorgehen bei der Chromatographie von Insulinlösungen ist in Abschnitt 6.1. gesondert beschrieben.

5. Vorversuche im äquilibrierten System

Nach den Angaben in der Literatur (KALLEE, 1952, 1954, 1969; KERP, 1966) besteht kaum ein Zweifel, daß es sich bei der Bindung von Insulin an Zellulose um eine teils unspezifische, teils spezifische Adsorption handelt.

Bei hinreichend niedrigen Insulinkonzentrationen werden Spuren von Insulin auch in Gegenwart eines großen Überschusses von Serumproteinen ziemlich fest an Zellulose adsorbiert und können nur durch Zusatz weiteren Insulins oberhalb einer kritischen Konzentrationsgrenze wieder desorbiert werden. Beispielsweise bleiben in der Papierelektrophorese Insulinmengen unter 2,5 bis 3 μg auch in Gegenwart von 700 μg Humanserumproteinen fest adsorbiert in der Umgebung der Auftragsstelle liegen, wenn das Gemisch von Serumproteinen und Insulin in einem Volumen von ca. 20 μl auf eine strichförmige Auftragsstelle von 30 mm auf Filtrierpapier aufgetragen wird (KALLEE, 1952; BURROWS et al., 1957). Erst wenn diesem System zusätzliches Insulin mikrogrammweise zugefügt wird, wandert das als Indikator dienende Radiojodinsulin um so weiter in Richtung zur Anode, je höher die aufgetragene Insulinmenge ist. Die volle Eigenbeweglichkeit des Insulins, die im Bereich zwischen Humanalbumin und Alphaglobulinen liegt, wird bei einer Insulinmenge von 20 bis 30 μg Rinderinsulin pro 30 mm Auftragsstelle erreicht (KALLEE u. MÜLLER, 1968).

Die Zellulosefasern des Filtrierpapiers können also offensichtlich hochspezifisch unterscheiden zwischen Insulinprotein und Nichtinsulin-Protein. Das spezifische Unterscheidungsvermögen der Zellulosefasern geht wahrscheinlich sogar in den Bereich der Speziesspezifität (MÜLLER, 1969).

Als Parameter, die einen Einfluß auf die Bindung von Insulin an Zellulose ausüben können, kommen grundsätzlich in Frage:

1. Zeit
2. Temperatur
3. Insulinkonzentration
4. Zelluloseart und -menge
5. Eiweißkonzentration und -zusammensetzung
6. Reinheit des Insulins und des Radioinsulins
7. pH
8. Ionenmilieu

Der pH-Wert wurde im physiologischen Bereich bei 7,4 festgelegt. Insulin ist in diesem Milieu stabil und auch in höheren Konzentrationen löslich.

Die Lösungen wurden 0,1 molar mit Phospat nach SØRENSEN gepuffert.

Die Temperatur wurde bei $4^{o}C$ festgesetzt. Dadurch ist die Reaktionsgeschwindigkeit zwar gegenüber Zimmertemperatur herabgesetzt, Bakterienwachstum wird jedoch vermieden. Auch sollte bei dieser Temperatur der Insulinabbau durch Alpha-2-Makroglobulin (DÜRR u. KALLEE, 1967 und DÜRR, 1970) nicht mehr ins Gewicht fallen.

Als Zellulose fand eine hochreine, faserige Nativzellulose Verwendung, die für ihre guten Bindungseigenschaften gegenüber Insulin bekannt ist.

Es waren also die Einflüsse folgender Parameter experimentell zu untersuchen:

1. Zeit
2. Insulinkonzentration
3. Menge des Adsorbens
4. Eiweißkonzentration

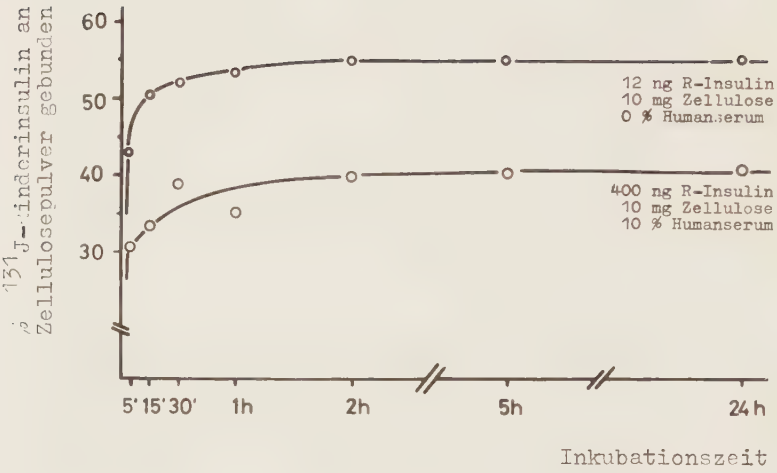


Abb. 1 Einfluß der Inkubationsdauer auf die Bindung von Rinderinsulin an Zellulosepulver MN 300 HR

Inkubationstemperatur 4°C
Nach 2 Stunden ist der Bindungsprozeß abgeschlossen. Es hat den Anschein, als ob die Adsorption bei Serumzusatz etwas langsamer abliefe als in Abwesenheit von Nichtinsulin-Protein, obwohl insgesamt weniger Insulin an Zellulose gebunden wird.

Als Maß für die Bindung dient der Bindungsgrad α .

Darunter ist

$$\alpha = \frac{m_{geb}}{m_E} = \frac{N_1 - N_2}{N_1 + N_2}$$

zu verstehen, wobei m_{geb} der Masse des im Gleichgewicht an Zellulose gebundenen Insulins, m_E der Gesamtmasse des Insulineinsatzes im System, N_1 und N_2 den Impulsraten des radioaktiven Insulins in den Gläsern 1 bzw. 2 entsprechen (siehe auch S. 2).

Der Einfluß von Verunreinigungen der Insulinpräparate auf die Bindung wurde in einer besonderen Versuchsreihe ermittelt (siehe Abschnitt 5.4.).

5.1. Versuche zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit

Bei Adsorptionsprozessen gelten das Massenwirkungsgesetz und die bekannten Abhängigkeiten der Reaktionsgeschwindigkeit von Temperatur, Druck und Konzentration.

Aus einer Reihe von Ansätzen zu 400 ng R-Insulin und 10 mg Zellulose mit 10% Humanserum wurde nach Inkubationszeiten von 1 Minute bis zu 24 Stunden der Bindungsprozeß durch Zentrifugieren unterbrochen und die prozentuale Insulinbindung α an Zellulose bestimmt. Eine weitere Reihe wurde mit 12 ng R-Insulin und 10 mg Zellulose in serumfreier Lösung erstellt. Alle Ansätze wurden dreifach bestimmt. In Abb. 1 ist der zeitliche Verlauf der Verteilung freien und gebundenen Insulins graphisch dargestellt.

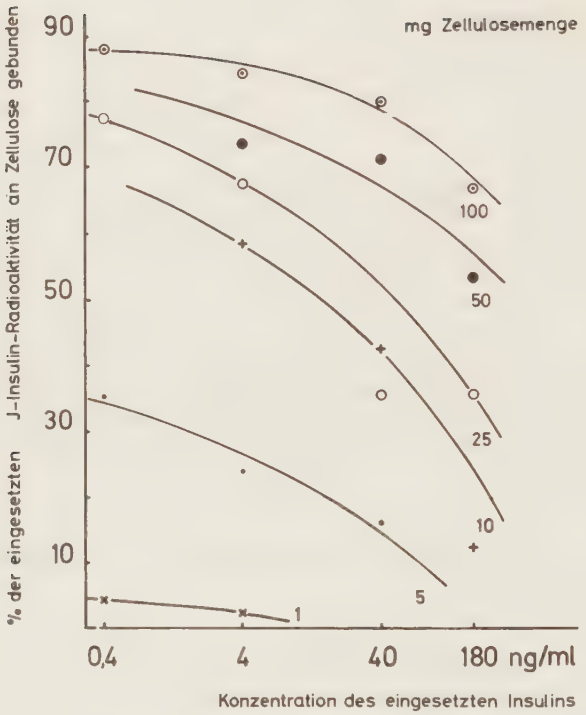


Abb. 2 Einfluß der Insulinkonzentration und der Zellulosemenge auf die Bindung von Rinderinsulin an Zellulosepulver MN 300 HR.

Volumen 1 ml
Serumgehalt 20 Vol.-%
Inkubationstemperatur 4°C

Der Adsorptionsgrad fällt mit steigendem Zusatz nicht markierten Insulins und mit abnehmender Adsorbensmenge.

Nach Ablauf von 2 Stunden ist bei 4°C der Gleichgewichtszustand zwischen freiem und zellulosegebundenem Insulin erreicht. Aus technischen Gründen wurde für die weiteren Versuche eine Inkubationszeit zwischen 10 und 12 Stunden gewählt, falls nicht anders angegeben.

5.2. Einfluß der Insulinkonzentration auf die Bindung an Zellulose

0,4, 4, 40 und 180 ng Rinderinsulin wurden mit Zusatz von 20 Vol.-% Humanserum im üblichen Ansatz mit 100, 50, 25, 10, 5 und 1 mg Zellulose inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden (Abb. 2).

Der Adsorptionsgrad α steigt mit zunehmender Adsorbensmenge und mit fallender Insulingesamtmenge an (siehe auch nächste Versuchsserie).

5.3. Vorversuche zur Bestimmung des Einflusses der Eiweißkonzentration auf die Bindung von Insulin an Zellulose

1 ml Lösung mit 2,67 ng ^{131}J-Rinderinsulin in einer Reihe mit 0, 5, 10, 20, 40 und 80 Vol.-% Humanserum wurden mit 5, 10, 25, 50 und 100 mg Zellulose versetzt. Die Inkubationsdauer betrug 24 Stunden.

Der Adsorptionsgrad α nimmt mit steigendem Serumgehalt der Insulinlösungen ab (Abb. 3).

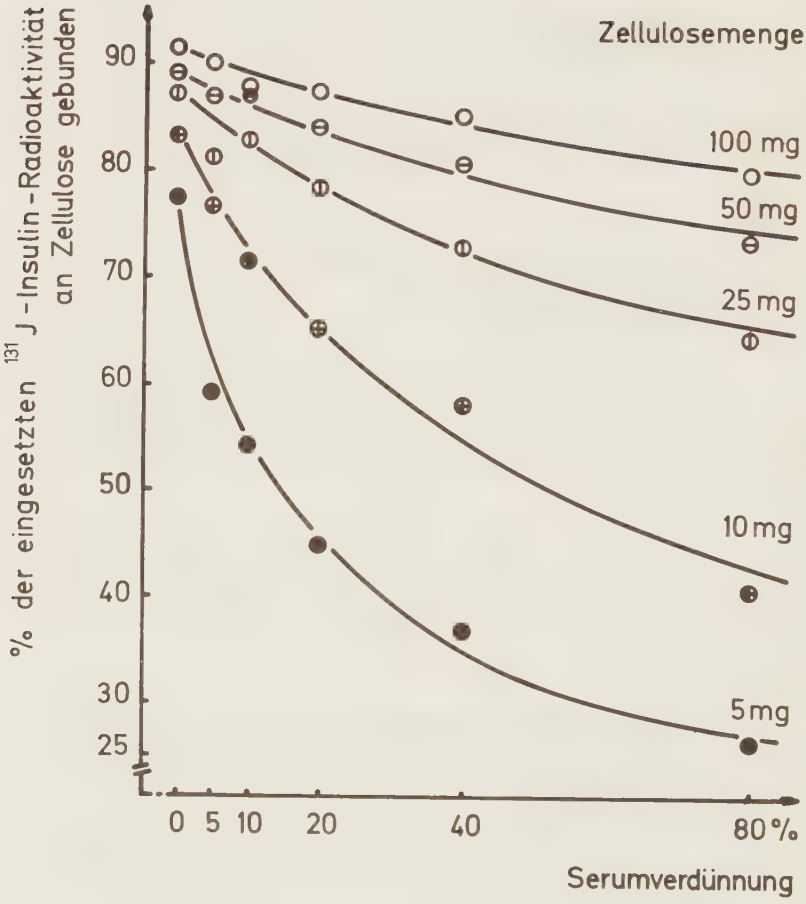


Abb. 3 Einfluß der Eiweißkonzentration auf die Bindung von Rinderinsulin an Zellulosepulver MN 300 HR.
Volumen 1 ml. Inkubationtemperatur 4°C

Der Adsorptionsgrad α nimmt mit steigendem Serumgehalt der Insulinlösungen ab.

5.4. Einfluß der Reinheit der verwendeten Insuline auf die Adsorption an Zellulose

Die Berechnung der Gleichgewichtslage beruht auf zwei wesentlichen Voraussetzungen:

1. radioaktiv markiertes und natives Insulin müssen sich bei der Bindung an Zellulose gleich verhalten,
2. die Insulinlösungen müssen frei sein von nicht an intaktes Insulin gebundener Radioaktivität.

Bei geringem Jodierungsgrad des Insulins bestehen gegen die Adsorptionsverhältnisse keine Bedenken (KALLEE, 1952, 1967, 1969 und KERP et al. 1966).

Unter der Einwirkung der radioaktiven Strahlung treten in ^{131}J-Insulin-Lösungen zahlreiche radioaktive Insulinspaltprodukte auf, die neben der biologischen Aktivität auch ihre Adsorptionsfähigkeit an Filtrierpapier verloren haben (BERSON u. YALOW, 1957; Literaturübersicht bei KALLEE, 1969). Man nimmt an, daß diese Strahlenschädigung chemisch über die Bildung von Wasserradikalen abläuft. Wegen zunehmender Strahlenschädigung wurden deshalb die Radioinsuline in den vorliegenden Untersuchungen nur bis zu 6 Tage nach dem Zeitpunkt der Jodierung verwendet.

Der Gehalt der Insulinlösungen an nichtadsorbierbarer Radioaktivität, also an freiem Jod und an Insulinspaltprodukten , läßt sich durch mehrfache Inkubation derselben Lösung mit Zellulose abschätzen. Zu diesem Zweck wurde jeweils der abgehobene 1/2 Überstand eines ersten Adsorptionsversuches

von 4 verschiedenen Versuchsreihen durch Zugeben von 0,5 ml HSA-Puffer auf 1 ml ergänzt, erneut mit der gleichen Zellulosemenge wie im 1. Versuch versetzt und wie üblich inkubiert und gemessen.

Die prozentualen Adsorptionsraten α sind in der Tabelle 1 angegeben:

Zellulose mg	10	n=6	100	n=6
Insulin	4 ng	4 μg	4 ng	4 μg
1. Adsorption $\alpha_1 \pm s$ %	91,6±0,3	58,5±0,7	98,6±0,05	98,5±0,04
2. Adsorption $\alpha_2 \pm s$ %	69,7±0,7	59,5±1,0	25,4±0,9	31,3±2,8
β %	2,6	16,8	1,1	1,0

Tabelle 1 Doppeladsorptionsversuch:

Adsorptionsgrad α, bezogen auf Gesamtinsulin im 1. Versuch (α_1), Gesamtinsulin im 2. Versuch (α_2). Anteil nicht adsorbierter Radioaktivität (β) in %, bezogen auf Gesamtaktivität im 1. Versuch. Volumen 1 ml.

Bei diesem Vorgehen ist die nicht adsorbierbare Radioaktivität in der gelösten Phase enthalten. Die Werte stellen das Mittel aus je 6 Einzelbestimmungen dar.

Im Versuch mit 100 mg Zellulose und 4 ng Insulin wurden von den 1,4% nicht gebundener Radioaktivität nach erstmaliger Adsorption im 2. Versuchsgang nur

noch 25,4% gebunden. Die im Überstand verbliebenen rund 75% hätten von der Bindungskapazität der Zellulose her wiederum zu über 98% gebunden werden müssen, falls es sich um adsorbierbares Insulin gehandelt hätte. So darf man annehmen, daß die 1,1% nicht adsorbierter Radioaktivität, bezogen auf die ursprüngliche Gesamtaktivität, ziemlich genau der im Ansatz enthaltenen nicht adsorbierbaren Insulinmenge einschließlich freien Jods entsprechen.

Bei den Versuchen mit 10 mg Adsorbens lagen die nicht gebundenen Anteile höher, da die absolute Gesamtadsorptionskapazität der Zellulose kleiner ist. Es war hier im Überstand auch nach zweimaliger Adsorption noch adsorbierbares freies Insulin in größerer Menge vorhanden.

Das verwendete Radioinsulin war nach den obigen Ergebnissen ziemlich rein, obwohl das kommerzielle Insulin seinerzeit sicher noch C-Peptid enthalten hatte. Da die Verfälschung der Meßergebnisse durch Insulinspaltprodukte und C-Peptid wohl innerhalb der übrigen Fehler der Methode liegen dürfte, ist eine Korrektur der bisherigen Ergebnisse nicht nötig.

5.5. Ergebnisse der Vorversuche im äquilibrierten System

1. Alles spricht dafür, daß es sich bei der Bindung von Insulin an Zellulose um einen Adsorptionsprozeß handelt. Insulinkonzentration, Adsorbensmenge und Gesamteiweißgehalt beeinflussen die Lage des Gleichgewichts zwischen gelöstem und zellulosegebundenem Insulin.

2. Der Adsorptionsgrad α des radioaktiven und des nicht markierten Insulins steigt bei sonst gleichen Bedingungen
   - mit abnehmender Insulinkonzentration,
   - mit zunehmender Menge des Adsorbens,
   - in serumeiweißhaltiger Lösung mit abnehmendem Eiweißgehalt der Lösungen.
3. Der Einfluß nichtadsorbierbarer Radioaktivität lag bei frischem Radioinsulin im Bereich von 1% der Gesamtmenge des Insulins.
4. Der Adsorptionsprozeß hat nach 2 Stunden die Gleichgewichtslage erreicht.
5. Die Gegenwart von Serumeiweißen verlangsamt den Bindungsprozeß geringfügig.

6. Adsorptionschromatographie

Eine weitere Prüfung der Adsorptionseigenschaften der Zellulose für Insulin ermöglicht die von TSWETT (1906) eingeführte Adsorptionschromatographie. Da hier Adsorptions- und Desorptionsvorgänge beim Durchströmen des Adsorbens vielmals hintereinander geschaltet sind, werden gering ausgeprägte Unterschiede der Adsorptionskräfte potenziert.

Wird die Menge des Adsorbens relativ klein gehalten, so kann die Adsorbatlösung das Adsorbens rasch wieder verlassen und es kommt nicht zu einer Auftrennung der Front des aufgegebenen Stoffgemisches (TURBA, 1954). Das Adsorbens soll imstande sein,

zwar eine Insulinmenge entsprechend der des Tracerinsulins zu binden, nicht jedoch das gesamte aufgegebene Insulin zurückzuhalten. Unter diesen Bedingungen sollte die aus der Säule wiedergewonnene Radioaktivität von der aufgegebenen Insulinmenge abhängen.

6.1. Methodik der chromatographischen Versuche

Die Chromatographie wurde als absteigende Säulenchromatographie in zellulosebeschickten Glasröhren von 10 mm lichter Weite durchgeführt. Die Rohre waren unten mit einer Glassinterplatte verschlossen und endigten in einer Auslaufspitze. Die in die Säule eingebrachte Zellulose wurde durch einen inerten Füllkörper "verdünnt", um eine gleichmäßige Durchdringung der sonst sehr dünnen Adsorbensschichten (10 bis 100 mg) zu gewährleisten. Dazu boten sich Glaskugeln an,die in verschiedenen Durchmessern zur Verfügung standen. Von einem Durchmesser von 0,11 mm an abwärts wurden die mit den Kugeln vermengten Zellulosefasern zwischen jenen festgeklemmt, während sie bei größeren Durchmessern zwischen den Kugeln fortgespült wurden und über der Filterplatte absedimentierten.

Ein Volumen von 6 ml dieser Glaskugeln wurde in einem Reagensglas zu der eingewogenen Zellulosemenge gegeben und auf einem Schüttelmixer vermengt. Nach dem Eingießen des Gemenges in die Chromatographiesäule und dreimaligem Aufstoßen auf die Tischplatte zur Verfestigung der Säulenfüllung wurde diese mit HSA-Puffer getränkt. Zum Ablaufen des Flüssigkeitsüberschusses und zur Durchfeuchtung der Zellulose wurden die Säulen 1/2 Stunde stehen

gelassen.

Mit Tracer-Insulin und nativem Insulin versetzte, wie eingangs beschrieben zusammengesetzte Reaktionslösung wurde dann auf die Säulen gegossen. Nach deren Einziehen wurde in 16 Portionen zu 0,2 ml HSA-Puffer nachgegeben und die aus der Säule abfließende Flüssigkeit in zur Radioaktivitätsmessung geeigneten Gläsern aufgefangen.

Zusätzlich wurde eine nur mit Glaskugeln beschickte und eine mit einem Überschuß an Zellulosepulver (5 g) gefüllte Säule in jeder Versuchsreihe mitgeführt. Mit der ersteren von diesen wurde die aus einer Säule ohne Zellulose eluierbare Insulinmenge als Grundlage für die Berechnung der Gesamtmenge an Insulin bestimmt, mit der letzteren der Anteil des im Reaktionsgemisch befindlichen nichtadsorbierbaren Insulins ermittelt. Die Eluate wurden im Szintillationszähler gemessen und die eluierte Insulinmenge in % der Gesamtmenge wirksamen Insulins berechnet.

Einen Überblick über die Versuchsreihen mit und ohne Eiweißzusatz bietet die Tabelle 2. Der Zusatz an HS bzw. 3,5% HSA-Lösung betrug 50% (Vol/Vol). Der eluierte Anteil der gesamten Insulinmenge ist für einen Teil der Versuche in Abb. 4, 5 und 6 graphisch dargestellt.

Variable Bedingungen	Konstante Bedingungen			Abb.
	Zellulose mg	Tracer-I. pg	Eiweiß	
0 - 100 mg Zellulose		4 R 40 S 400 R 8000 R	HSA HS HS HS	 4a 6
40 pg - 40µg Rinderinsulin	2,5 5 25 25 25 25 25 100	4 4 400 400 8000 8000 8000 8000	HS HS HSA HSA HS HSA HSA HS	 5c 5a 5d 5b
10 - 50 mg Zellulose	0 - 400 ng RI			6
40 pg - 4 µg Rinderinsulin	10 25 25 25 50	8000 400 2000 4000 4000		4c 4b

Tabelle 2 Übersicht über die säulenchromatographischen Bestimmungen. Über die Abkürzungen s.S. 5.

Abb. 4 Säulenadsorptionschromatographie

a) Abhängigkeit der eluierten ^{131}J-Insulin-Radioaktivität von der Menge des Adsorbens

Zellulose 0 - 50 mg
Rinderinsulin 400 pg
Serumzusatz 50 Vol.-%

b) und c) Abhängigkeit der eluierten ^{131}J-Insulin-Radioaktivität von der Konzentration zugesetzten nicht markierten Rinderinsulins.

Kein Serumzusatz

b) Zellulose 25 mg
Tracerinsulin 400 pg

c) Zellulose 10 mg
Tracerinsulin 8 ng

Temperatur 22°C

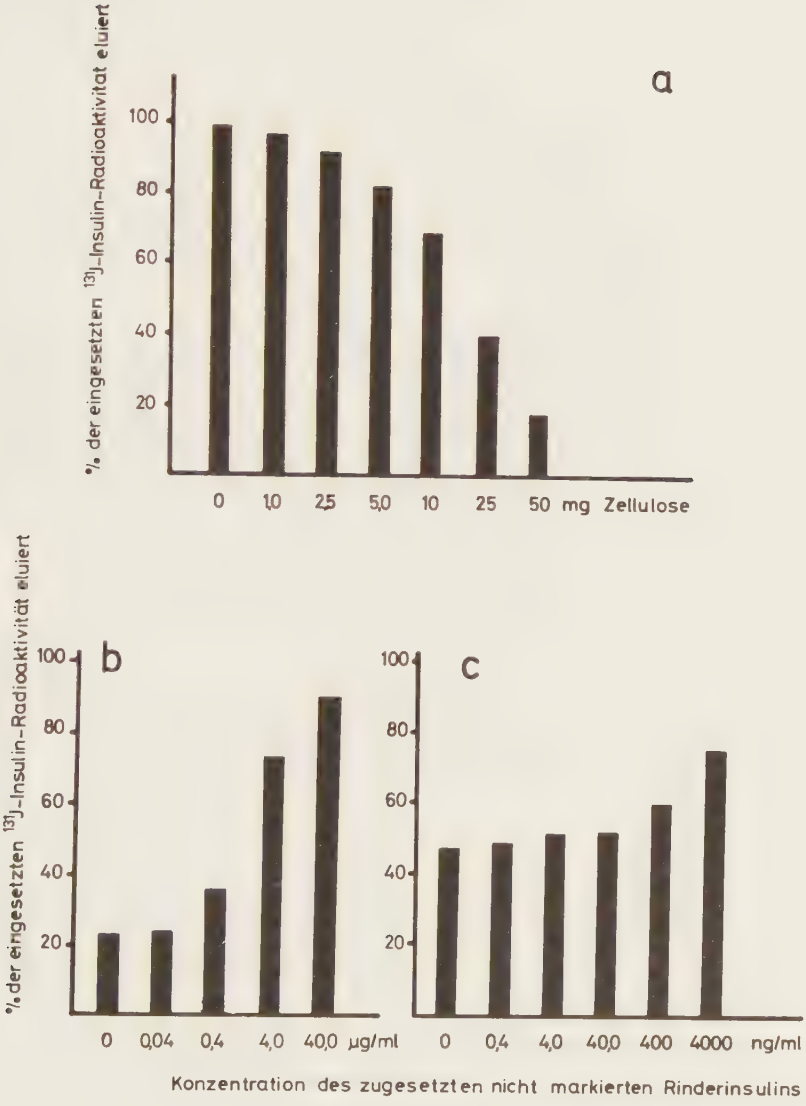

a
% der eingesetzten ^{131}J-Insulin-Radioaktivität eluiert
100
80
60
40
20
0
1,0
2,5
5,0
10
25
50 mg Zellulose
b
c
% der eingesetzten ^{131}J-Insulin-Radioaktivität eluiert
0
0,04
0,4
4,0
40,0 µg/ml
0
0,4
4,0
40,0
400
4000 ng/ml
Konzentration des zugesetzten nicht markierten Rinderinsulins

Abb. 5 Säulenadsorptionschromatographie

Abhängigkeit der eluierten ^{131}J-Insulin-Radioaktivität von der Konzentration zugesetzten nicht markierten Rinderinsulins.

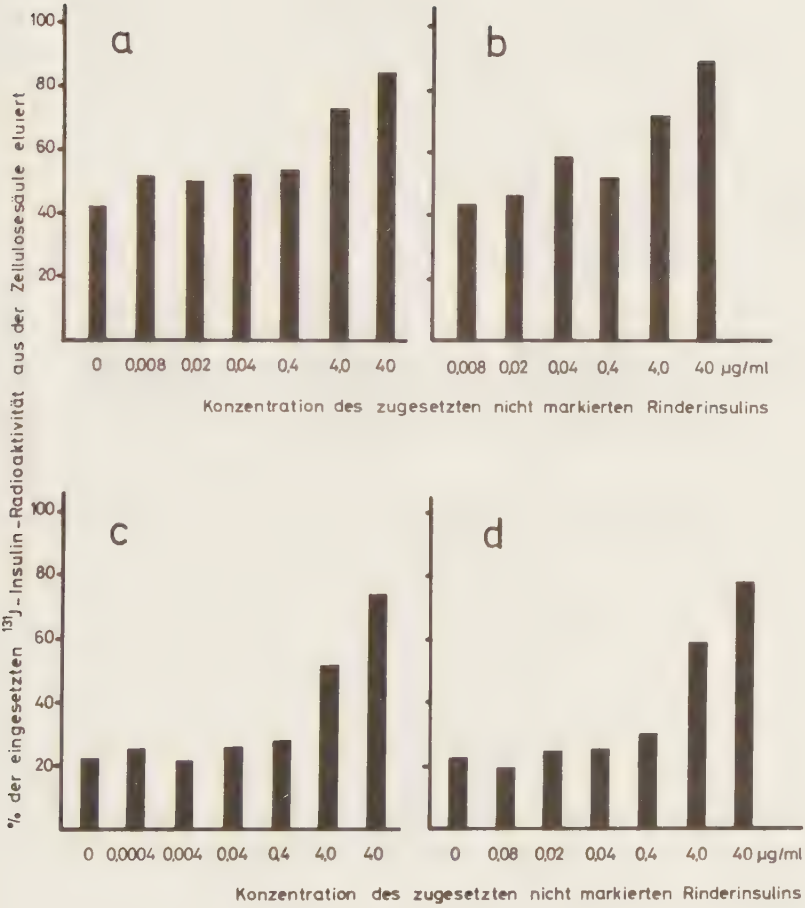
a) Zellulose 25 mg
Serumzusatz 50 Vol.-%
Tracerinsulin 8 ng
nicht markiertes Insulin 0 - 40 µg

b) Zellulose 100 mg
Serumzusatz 50 Vol.-%
Tracerinsulin 8 ng
nicht markiertes Insulin 8 ng - 40 µg

c) Zellulose 25 mg
3,5% HSA-Zusatz 50 Vol.-%
Tracerinsulin 400 pg
nicht markiertes Insulin 0 - 40 µg

d) Zellulose 25 mg
3,5% HSA-Zusatz 50 Vol.-%
Tracerinsulin 8 ng
nicht markiertes Insulin 0 - 40 µg

Temperatur 22°C


a
b
c
d
100
80
60
40
20
0
0,008
0,02
0,04
0,4
4,0
40
40 µg/ml
0,0004
0,004
0,08
% der eingesetzten 131J-Insulin-Radioaktivität aus der Zellulosesäule eluiert
Konzentration des zugesetzten nicht markierten Rinderinsulins

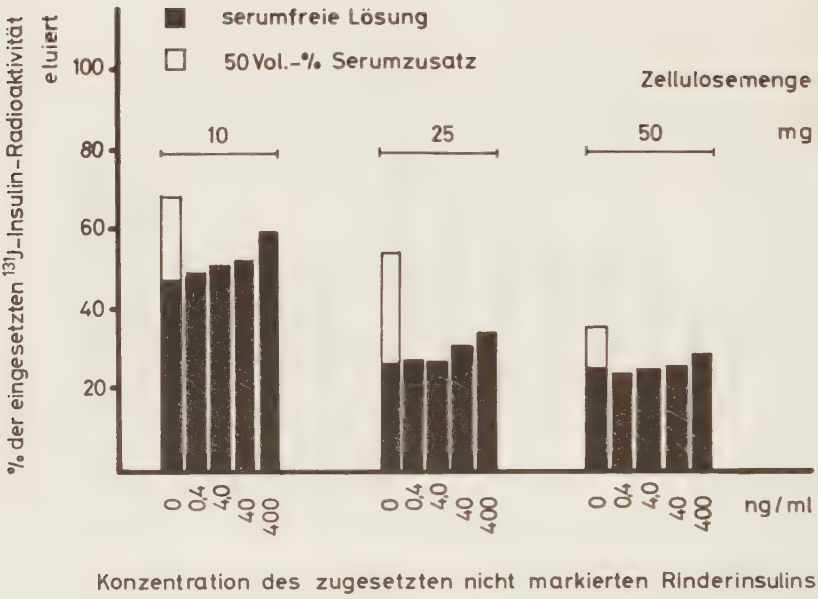


Abb. 6 Säulenadsorptionschromatographie

Abhängigkeit der eluierten ^{131}J-Insulin-Radioaktivität von der Konzentration des zugesetzten nicht markierten Rinderinsulins in Abwesenheit und in Gegenwart von Humanserum.

Temperatur 22°C

Bedingungen s. Tab. 2, S. 25

6.2. Zusammenfassung der chromatographischen Ergebnisse

1. Die Säulenadsorptionschromatographie erlaubt Aussagen über die Bindung von Insulin an Zellulose bis herab zu 1 mg Zellulose, wenn das Adsorbens in einem inerten Füllkörper gleichmäßig verteilt wird.

2. Der aus der Säule eluierte Anteil des markierten Insulins ist von der Konzentration des aufgegebenen Gesamtinsulins abhängig. Steigende Insulinmengen haben höhere Eluatmengen zur Folge.

3. Die Gegenwart von Serumeiweiß und Humanserumalbumin drückt die Insulinadsorption herunter, verhindert sie aber auch bei beträchtlichen Eiweißkonzentrationen nicht völlig.

4. Die Menge an Tracerinsulin ist ohne erkennbaren Einfluß auf die Insulinelution aus der Säule, ein Beweis für die Richtigkeit der Annahme: Spurenjodiertes Insulin verhält sich bei der Adsorption an Zellulose wie natives Insulin.

5. Nur im Konzentrationsbereich zwischen 40 ng und 40 μg Insulin/ml ist mit der Adsorptionssäulenchromatographie bei geeigneter Wahl der Bedingungen eine Bestimmung der Insulinkonzentration möglich.

7. Hauptversuch

Gleichgewicht zwischen freiem und zellulosegebundenem Insulin

7.1. Bestimmung der Adsorptionsisothermen für an Zellulose adsorbiertes Insulin

7.1.1. Begriffsbestimmung

Als Adsorption wird allgemein die Anreicherung eines Stoffes im Grenzgebiet zweier Phasen auf eine höhere Konzentration als in diesen selbst bezeichnet. Sie spielt sich im Phasengrenzgebiet unter dem Einfluß von Grenzflächenkräften ab. Diese letzteren sind von der Art der sich berührenden Phasen abhängig.

Nach der Art der Kräfte, die die adsorbierten Teilchen an der Oberfläche des Adsorbens festhalten, läßt sich unterscheiden zwischen:

1. Van-der-WAALSscher oder physikalischer Adsorption mit relativ geringer Festigkeit der Anlagerung,
2. chemischer Adsorption oder Chemisorption (z.B. H_2 an Platin) mit höherer Bindungsenergie,
3. elektrischer Adsorption, wie sie an Elektroden und bei geladenen Kolloidteilchen eine Rolle spielt.

Bei der Adsorption von Insulin an Zellulose kommt wohl nur die physikalische Adsorption in Frage, allenfalls noch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Bindungsorten an der Oberfläche der Zellulose und polaren Gruppen von Aminosäuren des Insulins.

7.1.2. Adsorptionsgleichgewicht

Bei der Adsorption stellt sich ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und gelöstem Adsorbatstoff ein. Es kann allgemein durch die Funktion

$$f(k,c,T) = 0$$

beschrieben werden, wobei $k = n/m$ die Molalität des adsorbierten Stoffes (n: adsorbierte Molzahl, m: Masse des Adsorbens), c die Konzentration des nichtgebundenen adsorbierbaren Stoffes in der Lösung und T die Temperatur bedeuten. Im Gegensatz zu Gasen sind Adsorptionsvorgänge in Lösungen vom Druck praktisch unabhängig.

Eine andere eingangs bereits verwendete Art der Darstellung bietet der Adsorptionsgrad $\alpha = f(c_o)$. Dabei steht c_o für die Konzentration des eingesetzten Gesamtinsulins.

Bei der Untersuchung von Adsorptionsgleichgewichten wird möglichst eine der Veränderlichen konstant gehalten. Bei konstanter Temperatur ergibt sich dann im System Lösung-festes Adsorbens die Adsorptionsisotherme

$$(k)_T = f(c),$$

bei konstantem Druck die Adsorptionsisobare

$$(k)_p = f(T),$$

bei konstanter Molalität die Adsorptionsisostere

$$(c)_k = f(T),$$

und bei konstanter Konzentration

$$(k)_c = f\ (T).$$

7.1.3. Vorgehen

Zur Bestimmung der Gleichgewichtslage zwischen freiem und zellulosegebundenem Insulin wurden Reihen zu 10 und 100 mg Zellulose mit steigenden Mengen Rinderinsulin in je 1 ml Lösung versetzt (Tab. 3). Über die weitere Behandlung der Ansätze siehe Abschnitt 4. Das Serum stammte von einer Patientin mit kombiniertem Mitralvitium.

	Adsorbens-Menge mg	Serumgehalt Vol.-%
1.	100	0
2.	10	0
3.	10	5
4.	10	10
5.	10	20
6.	10	40
7.	10	70

Tabelle 3 Übersicht über die bestimmten Adsorptionsisothermen.

Die Konzentrationsreihen umfaßten jeweils die Werte:

0,6 , 2, 4, 20, 40, 100, 200, 400 ng
1, 2, 4, 10, 20, 40 µg
Rinderinsulin/pro ml

7.1.4. Ergebnisse

Die erhaltenen Werte lassen sich graphisch als Relation des Adsorptionsgrades α zur Gesamtmenge des Insulins m_E darstellen (Abb. 7). Es ergibt sich eine Schar weitgehend ähnlicher Kurven, die parallel zur Abzisse zueinander verschoben sind. Steigender Gehalt an Serumeiweißen drückt den Adsorptionsgrad herab. α bleibt bei steigenden Insulinmengen bis zu einem Grenzwert jeweils lange konstant, um dann abzufallen.

Hinsichtlich der Lage des Gleichgewichts zwischen freiem und zellulosegebundenem Insulin sind die Adsorptionsisothermen aufschlußreicher als die obige Darstellung. Sie geben die Abhängigkeit der "Konzentration" des an Zellulose gebundenen Insulins als Molalität in Mol Insulin pro g Adsorbens von der Konzentration des nicht zellulosegebundenen Insulins in Mol Insulin/l Lösung an.

Im Diagramm Abb. 8 sind die umgerechneten Werte in doppelt-logarithmischem Maßstab aufgetragen. Die Werte innerhalb der verschiedenen Versuchsreihen gruppieren sich zu einer Schar paralleler Kurven. Deren Anfangsteile verlaufen weitgehend gerade, annähernd unter 45° zu den Achsen, und beginnen

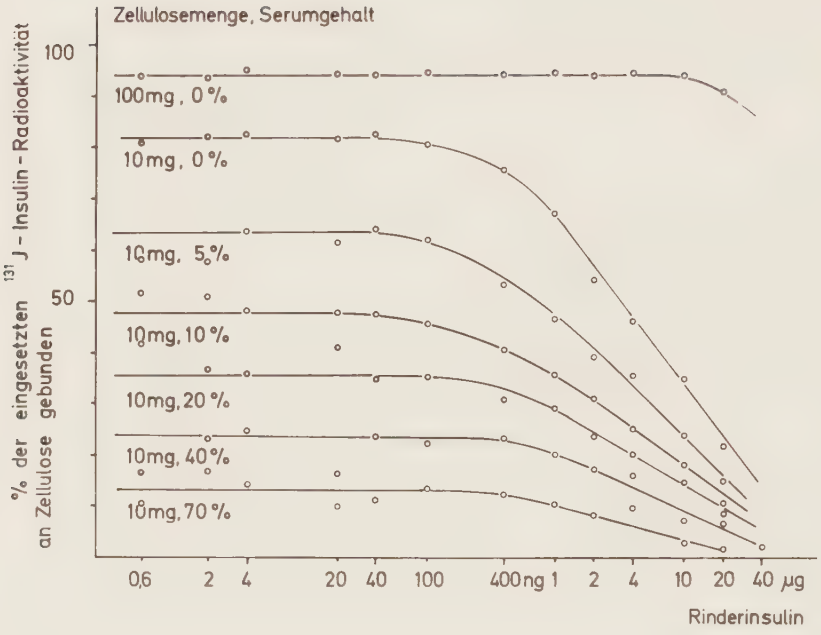
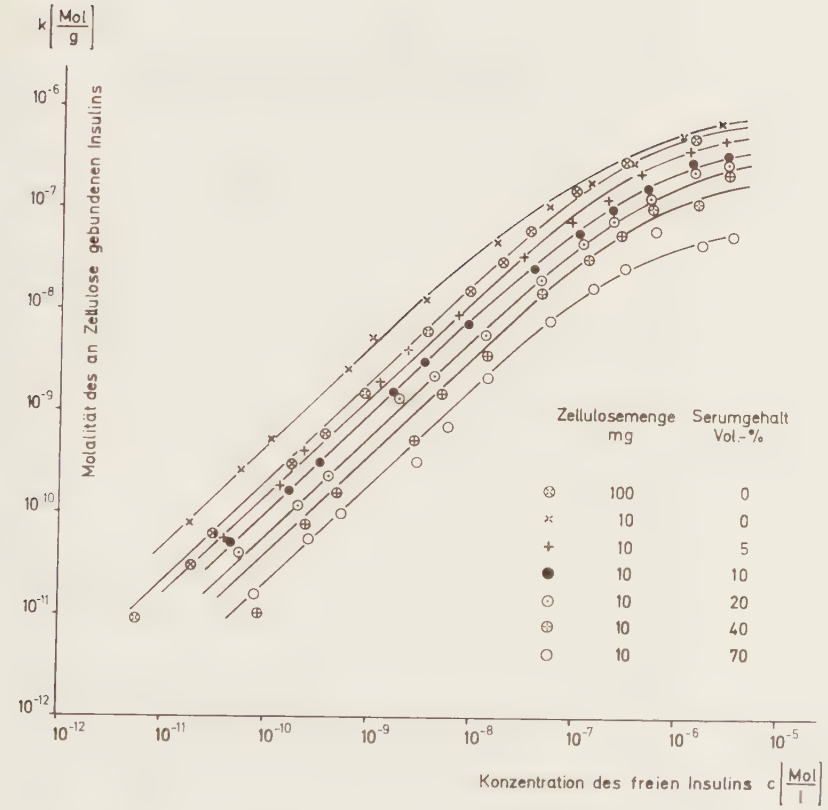


Abb. 7 Bindung von Rinderinsulin an Zellulosepulver MN 300 HR.

Adsorptionsgrad α in % des Gesamtinsulins in Abhängigkeit von der Gesamtmenge des Insulins, von der Menge des Adsorbens und vom Serumgehalt der Insulinlösungen.

Volumen 1 ml

Inkubationstemperatur 4°C



bb.8 Adsorptionsisothermen für an Zellulosepulver MN 300 HR adsorbiertes Rinderinsulin in Abwesenheit und Gegenwart von Humanserum.

Volumen 1 ml

Inkubationstemperatur 4°C

im Bereich höherer Konzentrationen gegen die Konzentrationsachse einzubiegen.

7.1.5. Mathematisch-statistische Auswertung und Diskussion der gewonnenen Abhängigkeiten

7.1.5.1. Die FREUNDLICHsche Adsorptionsisotherme

Für die Abhängigkeit des adsorbierten Stoffes von der Konzentration bei konstanter Temperatur stellte FREUNDLICH (1930/1932) eine einfache empirische Beziehung auf. Sie lautet für fest-flüssige Systeme

$$\frac{k}{k_o} = a\left(\frac{c}{c_o}\right)^B$$

Dabei stellen k die Molalität des Adsorbats, c die Konzentration des freien Adsorbatstoffes, k_o bzw. c_o die benutzten Einheiten dar.

a und B ($0 < B < 1$) sind temperaturabhängige Konstanten, die das jeweilige System charakterisieren. Bei graphischer Darstellung handelt es sich um Parabeln, die nur den Anfangsteil der Isothermen befriedigend beschreiben. Wird graphisch log c in Abhängigkeit von log k aufgetragen, läßt sich die FREUNDLICHsche Adsorptionsisotherme als Gerade darstellen.

Die experimentell gewonnenen ersten 6 bis 8 Punkte der Kurven streuen nur wenig um die nach der GAUSSschen Methode der kleinsten Abweichungsquadrate berechneten Ausgleichsgeraden. Ihre

Steigungen liegen sehr nahe bei 1,0 , das heißt die Kurven stellen in diesem Fall auch in linearer Darstellung eine Gerade dar. Der Exponent B der Gleichung beträgt also im vorliegenden Fall 1 . Die Werte für die Steigung b, den Achsenabschnitt a auf der Ordinate und die Quadrate der Korrelationskoeffizienten in doppeltlogarithmischer (log c/log k) und in linearer (c/k) Darstellung der Wertepaare können der Tabelle 4 entnommen werden.

7.1.5.2. Die LANGMUIRsche Adsorptionsisotherme

Einen großen linearen Anfangsteil weist auch die von LANGMUIR (1916) theoretisch abgeleitete Isotherme auf (nach BRDIČKA, 1969). Da sich aus der LANGMUIRschen Theorie Rückschlüsse auf den Adsorptionsmechanismus ziehen lassen, sei auf sein Modell näher eingegangen.

LANGMUIR geht davon aus, daß der adsorbierte Stoff an der Oberfläche des Adsorbens eine monomolekulare Schicht bildet, wobei die Oberfläche homogen und in untereinander gleichwertige Elementarbezirke unterteilt sei. Jeder von ihnen kann höchstens ein Molekül binden, weiter sollen zwischen den adsorbierten Molekülen keine lateralen Wechselwirkungen bestehen. Die Elementarbezirke werden bei Vergrößerung der Konzentration in zunehmendem Maße besetzt, bis schließlich eine Sättigung erreicht ist und bei weiterer Zunahme der Konzentration keine weiteren Moleküle gebunden werden können (siehe Abb. 13 a+b). Im Gleichgewichtszustand werden dann in

Zellulose mg	HS %	log c/log k			c/k			$c/\frac{c}{k}$		
		b	a	r^2	b $\left[\frac{g}{l}\right]$	a $\left[\frac{Mol}{g}\right]$	r^2	b $\left[\frac{g}{Mol}\right]$	a $\left[\frac{g}{l}\right]$	r^2
100	0	0,99	-0,91	0,990	0,16	$4,6 \cdot 10^{-11}$	0,999	$1,6 \cdot 10^{-7}$	5,8	0,994
10	0	0,97	-1,03	0,952	0,31	$9,5 \cdot 10^{-11}$	0,995	$2,8 \cdot 10^{-7}$	2,5	0,974
10	5	0,97	-1,06	0,957	0,11	$5,5 \cdot 10^{-11}$	0,998	$1,8 \cdot 10^{-7}$	8,0	0,982
10	10	0,96	-1,42	1,000	0,09	$1,5 \cdot 10^{-12}$	1,000	$2,5 \cdot 10^{-7}$	12,5	0,984
10	20	0,94	-1,38	0,921	0,04	$1,5 \cdot 10^{-11}$	0,999	$2,9 \cdot 10^{-7}$	19,3	0,981
10	40	0,91	-1,80	0,872	0,03	$2,4 \cdot 10^{-11}$	0,999	$3,9 \cdot 10^{-7}$	35,7	0,884
10	70	0,90	-1,92	0,824	0,01	$1,3 \cdot 10^{-12}$	0,993	$1,7 \cdot 10^{-8}$	64,3	0,993

Tabelle 4 Parameter und Quadrate der Regressionskoeffizienten der Ausgleichsgeraden y=bx+a der Adsorptionsisothermen für an Zellulosepulver gebundenes Rinderinsulin in logarithmischer (log c/log k), linearer (c/k) und nach LANGMUIR linearisierter ($c/\frac{c}{k}$) Darstellung.

der Zeiteinheit gleich viele Moleküle adsorbiert wie desorbiert, wobei die Adsorptionsgeschwindigkeit der Konzentration in der Lösung und dem freien Bruchteil der Gesamtoberfläche des Adsorbens und die Desorptionsgeschwindigkeit dem besetzten Bruchteil der Oberfläche proportional sind.

Unter diesen Voraussetzungen kommt LANGMUIR (s. BRDIČKA, 1969) zu der Formel:

$$k = k_{max} \frac{c}{\beta + c}$$

wobei β und k_{max} Konstanten sind. Wird die LANGMUIRsche Adsorptionsisotherme auf die Form

$$\frac{c}{k} = \frac{\beta}{k_{max}} + \frac{c}{k_{max}}$$

gebracht, so läßt sie sich graphisch als Gerade $y = bx + a$ darstellen, wobei $y \hat{=} \frac{c}{k}$,

$a \hat{=} \frac{\beta}{k_{max}}$, $b \hat{=} \frac{1}{k_{max}}$, $x \hat{=} c$.

Eine übersichtliche graphische Darstellung der experimentellen Werte anhand der Beziehung c zu c/k war hier wegen der Erstreckung über viele Zahnerpotenzen nicht möglich. Wie die Ausgleichsrechnung bestätigt, liegen die Wertepaare im gesamten untersuchten Bereich auf Geraden. Die Parameter der Geraden und die Quadrate der Regressionskoeffizienten können der Tabelle 4 ent-

nommen werden.

7.1.5.3. Fehlerabschätzung

1. Fehler der Einzelwerte $\frac{c}{k}$

Zur Abschätzung der Abweichung der c/k-Meßwerte (c/k_{exp}) von der Ausgleichskurve wurden unter Verwendung der zugehörigen Konzentration c und der Gleichung der linearisierten Isotherme die theoretisch aufgrund der Abhängigkeit zu erwartenden c/k -Werte (c/k_{theor}) berechnet. Die Abweichung des Quotienten

$$q = \frac{c/k_{exp}}{c/k_{theor}}$$

von 1 ist ein Maß für die gesuchten Fehler von c/k.

In Abb. 9 ist q für eine Isotherme (100 mg Zellulose ohne Serum) graphisch über der Konzentration c dargestellt. Fast sämtliche experimentellen Werte liegen innerhalb eines Bereiches von $\pm$ 10% der aus der Isotherme errechneten.

2. Zählstatistische Fehler der Messungen und ihre Fortpflanzung

Die Unsicherheiten bei der Ermittlung der Zählraten wirken sich vor allem auf den Wert

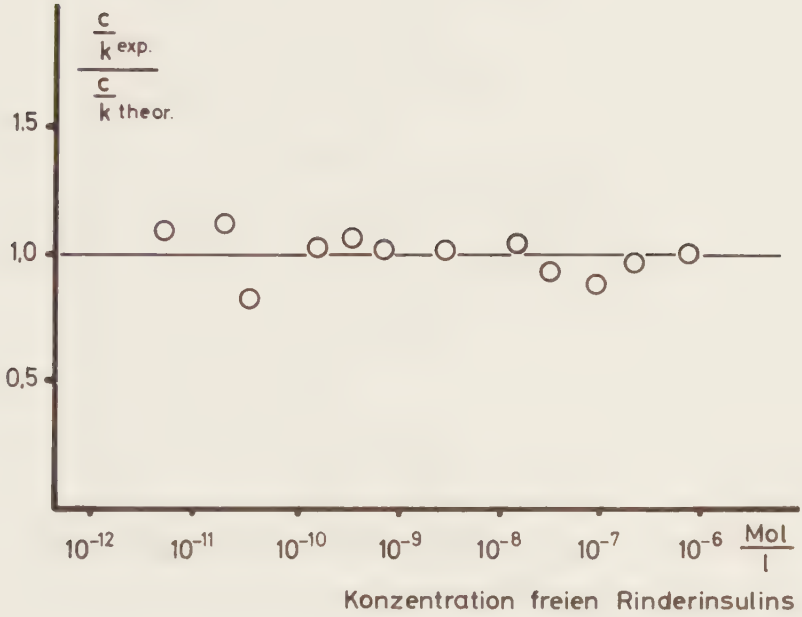


Abb. 9 Zur Fehlerabschätzung der linearisierten Adsorptionsisotherme für Rinderinsulin an 100 mg Zellulosepulver MN 300 HR. Kein Serumzusatz

Dargestellt ist der Quotient q aus experimentell gewonnenen und errechneten c/k-Werten.

von k aus. Ausgehend von dem Rechenansatz für die Molalität adsorbierter Zellulose

$$k = \frac{N_2 - N_1}{N_2 + N_1} \cdot \frac{m_1}{M}$$

wobei N_1 und N_2 die Zählraten, m_1 die adsorbierte und M die Gesamtmasse des Insulins darstellen, ergibt sich der relative Fehler der Molalität zu

$$\frac{\Delta k}{k} = 2 \cdot \frac{\frac{N_1}{N_2}}{1 - \left(\frac{N_1}{N_2}\right)^2} \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}$$

Diese Fehler lassen sich in dem Diagramm Abb. 8 wegen ihrer Kleinheit nicht eintragen.

3. Fehler durch nicht adsorbierbares ("Damage"-) Insulin und freie Radioaktivität

In den Ansätzen vorhandene nicht adsorbierbare Radioaktivität bewirkt Fehler vor allem bei der Berechnung der Konzentration c. Ihre Anwesenheit führt zu einer scheinbaren Erhöhung der Werte.

Nach

$$(1) \quad c_{wahr} = c - \Delta c = c - \frac{\frac{N_v}{N_o}}{V} \cdot \frac{M}{V}$$

errechnete sich die wirksame Insulinkonzentration für $N_v/N_o = 1 \cdot 10^{-2}$ (siehe S. 21) zu

$$(2) \quad c_{wahr} = c - 1 \cdot 10^{-2} \cdot \frac{M}{V}$$

Darin bedeuten

M = Masse des zugesetzten Insulins einschließlich des nicht adsorbierbaren "Damage"-Insulins (BERSON u. YALOW, 1957)

V = Volumen des Ansatzes

c = Konzentration des Insulins im Gleichgewicht

c_{wahr} = wirksame Insulinkonzentration im Gleichgewichtszustand d.h. ohne "Damage"-Insulin

$\frac{N_v}{N_o}$ = Anteil des "Damage"-Insulins bezogen auf M

Δc = Korrekturwert für Insulinkonzentration im Gleichgewicht

Eine Übersicht über Δc bei kleinen und großen Konzentrationen gibt Tabelle 5 für die beiden Isothermen ohne Serumzugabe im Ansatz.

Zellulose-menge /mg	M/V	c	Δc	c_{wahr}
100	$9,6 \cdot 10^{-11}$ $6,4 \cdot 10^{-6}$	$5,7 \cdot 10^{-12}$ $1,4 \cdot 10^{-6}$	$9,6 \cdot 10^{-13}$ $6,4 \cdot 10^{-8}$	$4,7 \cdot 10^{-12}$ $1,3 \cdot 10^{-6}$
10	$9,6 \cdot 10^{-11}$ $3,2 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-11}$ $2,5 \cdot 10^{-6}$	$9,6 \cdot 10^{-13}$ $3,2 \cdot 10^{-8}$	$1,7 \cdot 10^{-11}$ $2,5 \cdot 10^{-6}$

Tabelle 5 Übersicht über Korrekturen der Konzentration freien Insulins Δc in Abhängigkeit von M/V bei 1% nicht adsorbierbarer Radioaktivität. Konzentrationsangaben in Mol/l.

Die errechneten Korrekturen sind klein. Lediglich im Anfangsteil der Isotherme (100 mg Zellulose, 0% HS) bewirken sie eine Änderung der ersten Stelle des Konzentrationswertes eben um einen Zähler. Auf eine Darstellung dieser Korrekturen im Diagramm Abb. 8 wird verzichtet.

Die scheinbare Erhöhung der Konzentration freien Insulins macht sich besonders im Bereich hoher Adsorptionsgrade, also bei großen Zellulosemengen und kleiner Insulinkonzentration bemerkbar. Unter diesen Umständen könnte bei höherem Gehalt der Lösungen an nicht adsorbierbarer Radioaktivität ein Großteil der im Überstand gemessenen Aktivität nicht adsorbierbarem Material entsprechen, und nur ein kleinerer Teil könnte freies Insulin darstellen.

Jedoch strebt der Adsorptionsgrad α bei kleiner werd der Insulinkonzentration grundsätzlich nicht gegen

$(100-N_v/N_o)\%$. Der Anteil des "Damage"-Insulins darf also nicht gleich $(100-\alpha_{max})\%$ gesetzt werden. Im folgenden wird der obere Grenzwert des Adsorptionsgrades α_{max} für $c \longrightarrow 0$ abgeleitet.

4. Berechnung des maximalen Adsorptionsgrades

Ausgehend von der Gleichung der LANGMUIR-Isotherme

$$(1) \qquad \frac{c}{k} = \frac{\beta}{k_{max}} + \frac{c}{k_{max}}$$

und dem Ausdruck für den Adsorptionsgrad

$$(2) \qquad \alpha = \frac{k \cdot M_{Zell}}{V \cdot c}$$

ergibt sich für den Grenzwert für $c \longrightarrow 0$ aus der umgeformten LANGMUIR-Gleichung

$$k = k_{max} \cdot \frac{c/\beta}{1 + c/\beta}$$

$$(3) \qquad k_{c \longrightarrow o} \cong k_{max} \cdot \frac{c}{\beta} = \frac{1}{a} \cdot c$$

wenn für $a = \frac{\beta}{k_{max}}$ setzt wird (s.S. 41).

Aus Gleichung (3) eingesetzt in (2) und Umformung errechnet sich der maximale Adsorptionsgrad für $c \longrightarrow 0$ zu

$$\alpha_{(c \longrightarrow 0)} = 1 - a \cdot \frac{V}{M_{Zell}} \cdot$$

Für die zwei experimentell gewonnenen Isothermen ohne Eiweißzusatz sind die errechneten maximalen Adsorptionsgrade α_{theor} in der Tabelle 6 den tatsächlich gefundenen Werten α_{exp} für die kleinsten untersuchten Konzentrationen gegenübergestellt. Experiment und Rechnung stimmen gut überein.

Zellulose mg	α_{exp} %	α_{theor} %
100	95	95
10	82	80

Tabelle 6 Experimentell und theoretisch-rechnerisch ermittelte maximale Adsorption von Rinderinsulin an Zellulosepulver bei 1% Gehalt an "Damage"-Insulin.

7.2. Abhängigkeit der Insulinbindung von der Eiweißkonzentration

In Abb. 10 ist für Konzentrationen freien Insulins von 10^{-13} bis 10^{-5} Mol/l die Molalität des an Zellulose adsorbierten Anteils in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an Humanserum aufgetragen. Die Werte für die Molalität k wurden aus den Isothermengleichungen für 0 bis 70% Serumzusatz (siehe S. 40) für jeweils die gleichen Insulinkonzentrationen berechnet. Die Punkte gleicher Insulin-Konzentration liegen in erster Annäherung auf einer Schar absteigender paralleler Geraden bei loga-

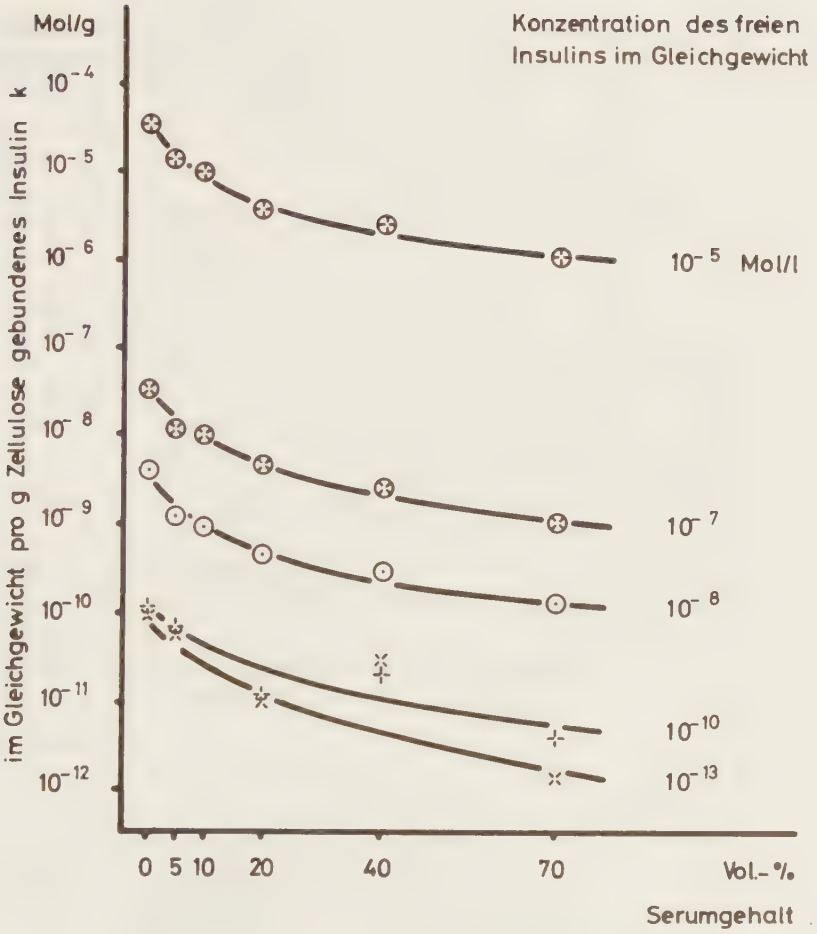


Abb. 10 Einfluß des Serumgehaltes auf die Adsorption von Rinderinsulin an Zellulosepulver

Volumen: 1 ml

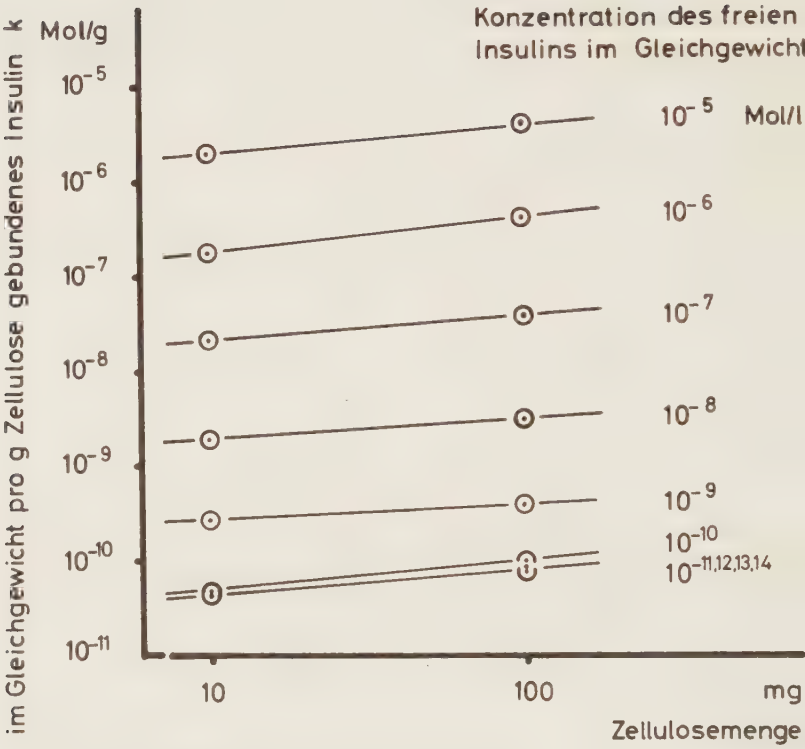


Abb. 11 Einfluß der Zellulosemenge auf die Bindung von Rinderinsulin an Zellulosepulver MN 300 HR in Gegenwart von 2,5 g Humanserumalbumin/l

Volumen: 1 ml

rithmisch geteilter Molalitätsachse. Bei zunehmender Eiweißkonzentration nimmt die Insulinbindung ab. Auch Zusatz von 70% Serum kann die Adsorption nicht völlig verhindern.

7.3. Einfluß der Menge des Adsorbens auf die Insulinbindung

Aus den Adsorptionsisothermen wurde für eine Reihe von Insulinkonzentrationen die jeweilige Molalität des an 10 und 100 mg Zellulose gebundenen Insulins berechnet. Die Werte sind in Abb. 11 graphisch in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration dargestellt. Die Molalität an Zellulose gebundenen Insulins steigt mit zunehmender Menge des Adsorbens an, was nicht ohne weiteres in Anbetracht der Definition des Begriffes Molalität zu erwarten ist.

8. Diskussion

Die experimentell gewonnenen Werte für die Konzentration c und die Molalität k an Zellulose adsorbierten Insulins fügen sich gut in die von LANGMUIR (1916) abgeleitete Isotherme ein. So dürfte der Adsorptionsprozeß tatsächlich nach einem Mechanismus ablaufen, dem das LANGMUIRsche Modell zumindest sehr nahe kommt. Die LANGMUIRsche Vorstellung ist für das einfachste Adsorptionssystem mit Modellcharakter erarbeitet, das aus zwei Phasen mit drei Stoffen bestehen muß. Angewandt auf unseren Fall würde das bedeuten: Zellulose als feste und Wasser als flüssige Phase, zwischen denen sich Insulin als gelöster Stoff im Phasengrenzgebiet an-

reichert.

In praxi ist ein derartiges ideales System kaum zu verwirklichen, am ehesten noch für Gase, z.B. für Stickstoff und Holzkohle (BRDIČKA, 1969).

In flüssig-festen Systemen spielen oft Reaktionen des Adsorbatstoffes mit den Behälterwänden eine Rolle. Ganz ausgeprägt gilt dies für unser Zellulose-Insulinlösung-System, bei dem lediglich durch Zusatz von Serumalbumin die Adsorption des Insulins an die Glasgefäße in nicht mehr störende Bereiche zurückgedrängt werden kann. Ferner üben wahrscheinlich die zur Pufferung auf einen definierten pH-Wert verwendeten Salze einen hier nicht untersuchten Einfluß aus. Einige Beobachtungen hierzu haben KERP et al. (1966) angestellt.

Schließlich wird bei einem Teil unserer Untersuchungen ein "4. Stoff" in Form von Serumeiweiß zugesetzt. Das Serumeiweiß stellt aber keinen einheitlichen "Stoff", sondern ein komplexes Gemisch von Proteinen dar, in dem zahllose Komponenten mit Hilfe der Elektrophorese und Immunelektrophorese in unterschiedlicher Konzentration nachgewiesen worden sind (KARLSON, 1964). Sie weisen unterschiedlichen Molekülbau auf, und so dürften ihnen wohl auch ganz verschiedene Einflüsse auf Adsorptionsprozesse zukommen.

Dem Serum zugesetztes reines Kristallinsulin läßt sich quantitativ mit immunologischen Methoden wieder gewinnen (JØRGENSEN, 1969), ohne daß man daran Veränderungen feststellen könnte. Mit Hilfe verschiedener elektrophoretischer Fraktionierungsmethoden konnte nachgewiesen werden, daß zumindest ein Teil des Insulins locker und reversibel an

Albumine, α_1, α_2, β- und γ- Globuline gebunden vorliegt (KALLEE, 1952; MITCHELL, 1963; STEIGERWALD et al., 1960). Eine besondere Rolle spielt dabei das α_2 Makroglobulin (KALLEE u. LOHSS, 1960; DÜRR und KALLEE, 1967; DÜRR, 1970), dem zusätzlich Insulinaseaktivität zukommt. Ferner konnte die Bindung des Insulins an Proteine mit z.T. etwas widersprüchlichen Ergebnissen durch Gelfiltration bestätigt werden (GJEDDE, 1967), während Untersuchungen mit der Ultrazentifuge keine sicher erkennbare Bindung ergaben (BERSON und YALOW, 1962; CHAO et al., 1965).

Werden also serumeiweißhaltige Insulinlösungen mit Zellulose versetzt, so bindet sich Insulin einerseits an Zellulose, zum anderen aber auch zumindest an einen Teil der Proteine und in geringen Mengen an das Glas der Gefäße. Für jedes der sich einstellenden Bindungsgleichgewichte gilt hier allgemein

$$k = f\ (c_{frei}),$$

wobei c_{frei} für die Konzentration des nicht gebundenen und k für die Molalität des im Gleichgewicht gebundenen Adsorbatstoffes steht. Die sich gegenüber verschiedenen Adsorbentien einstellenden Gleichgewichte für ein und denselben Adsorbatstoff stehen über dessen für diese Reaktionen gemeinsame Konzentration c_{frei} miteinander in Verbindung.

In dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten System liegen die Verhältnisse noch komplizierter, da nicht nur ein einziger Stoff der Adsorption unterworfen ist. Adsorptionsprozessen unterliegen jeweils die zahlreichen in biologischen Flüssig-

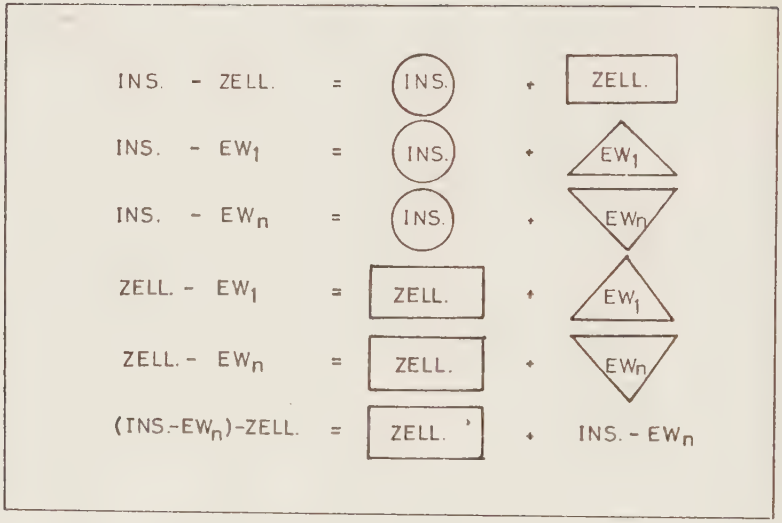


Abb. 12 Schematische Darstellung von Gleichgewichten im Insulin-Serumeiweiß-Zellulose-Adsorptionssystem.
Die Gleichgewichte sind über die gemeinsamen Konzentrationen der freien (in der Abb. eingerahmten) Substanzen miteinander verkettet.

keiten enthaltenen Eiweißsubstanzen sowohl untereinander als auch gegenüber der Zellulose (siehe Abb. 12). Um die Bindungsplätze an der Zellulose konkurrieren also viele Substanzen, ohne daß sich anhand der vorliegenden Untersuchungen eine Aussage darüber machen ließe, ob sämtliche Bindungsplätze gleichwertig sind.

Da Insulin trotz Gegenwart einer bis zu 10^{10}fachen Menge an anderen Proteinen noch in beträchtlichen Mengen adsorbiert wird, spricht das für eine Bevorzugung des Insulins gegenüber anderen Proteinen durch Zellulose (KALLEE, 1952, 1954). Die Isothermen verlaufen also für Insulin mit größerer Steilheit als für die anderen Eiweiße.

Auf molekularer Ebene ließe sich dieser Sachverhalt durch die Annahme gegenseitiger Behinderung größerer Moleküle an der Oberfläche des Adsorbens erklären. Die kleineren Insulin-Moleküle könnten dann möglicherweise trotz völliger Belegung der Oberfläche mit großen Molekülen in Lücken zwischen diesen noch Platz finden. Trotz Erreichen von k_{max} z.B. für Albumin würden so noch freie Plätze für Insulin bestehen (siehe Abb.13). Auch ist mit Wechselwirkungen zwischen adsorbierten Molekülen und mit der Bindung von Insulin-Eiweißkomplexen zu rechnen.

Die Beschreibung der Verteilung von Insulin im serumhaltigen Zellulose-Adsorptionssystem ist summarisch und für jeweils festgelegte Bedingungen exakt moglich. Eine vollständige Erfassung würde jedoch eine Bestimmung sämtlicher Partialgleichgewichte und Komponenten voraussetzen, ohne daß man dabei die übrigen Verhältnisse stören dürfte.

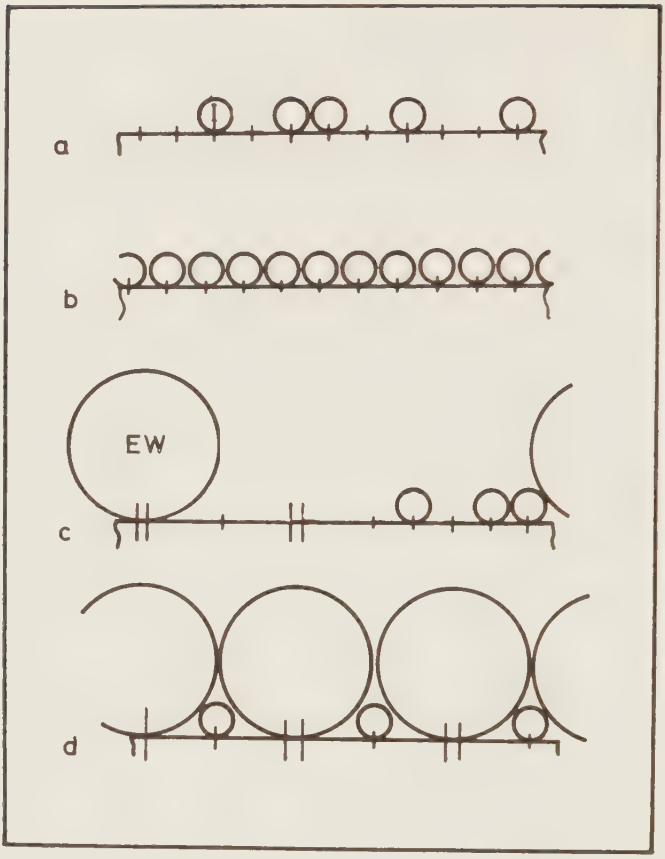


Abb. 13 Modell der Bindungsplätze für Insulin- und Eiweißmoleküle an der Oberfläche der Zellulose. - a: bei geringer Insulinkonzentration, b: Sättigung der Zellulose mit Insulin, c: bei geringer Insulin- und Eiweißkonzentration, d: Sättigung der Zellulose mit Insulin und Eiweiß bei Eiweißüberschuß.

9. Zusammenfassung

1. Mit Hilfe ^{131}J-markierten Insulins läßt sich die Bindung von Insulin an Zellulose auch in Gegenwart eines mehrhundertfachen Überschusses an Serumeiweiß bestimmen. Es werden zwei Verfahren angewandt:

   a) Inkubation von Zellulosepulver MN 300 mit Insulinlösungen (Batch-Verfahren),

   b) Zellulosesäulen-Adsorptionschromatographie.

2. Bei der Bindung von Insulin an Zellulose handelt es sich um einen Prozeß mit allen Kriterien der Adsorption an die Oberfläche eines Adsorbens.

3. Es werden die Adsorptionsisothermen bei Konzentrationen des freien Insulins zwischen 10^{-14} und 10^{-6} Mol/l und Eiweißkonzentrationen von 0,25% Humanserumalbumin sowie bis zu 70 Vol.-% Humanserum ermittelt.

4. Der Bindungsprozeß gehorcht der FREUNDLICHschen und der LANGMUIRschen Adsorptionsisotherme. Die Parameter der Gleichungen werden errechnet.

5. Steigender Gehalt an Serumproteinen drückt die Adsorption von Insulin herunter. Der Einfluß gehorcht in erster Näherung einer Exponentialfunktion.

6. Der Einfluß der Menge des Adsorbens auf die Molalität gebundenen Insulins ist bei sonst gleichen Bedingungen durch eine konkurrierende Adsorption auch von Serumeiweißen an die Zellulose

zu erklären.

7. Für das System Insulin-Serumeiweiß-Zellulose wird ein auf den LANGMUIRschen Voraussetzungen basierendes Modell angegeben, das einen Überblick über die gegenseitige Beeinflussung aller im System befindlichen Stoffe bietet. Daraus lassen sich Anhaltspunkte für das Zusammenwirken der Inhaltsstoffe des Blutserums, insbesondere von Insulin und Eiweißen gewinnen.

Literaturverzeichnis

BERSON,S.A. and R.S.YALOW
Recent studies on insulin-binding antibodies.
Ann.NY.Acad.Sci. 82, 338-344 (1959).

BERSON,S.A. and R.S.YALOW
Immunoassay of plasma insulin.
Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology
14, 182-201 (1962).

BERSON,S.A., R.S.YALOW, A.BAUMAN, M.A.ROTHSCHILD, and K.NEWERLY
Insulin I-131 metabolism in human subjects.
Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.
J.Clin.Invest. 35, 170-190 (1956).

BRDIČKA,R.
Grundlagen der physikalischen Chemie.
8. Aufl., Berlin: Deutscher Verlag der Wissenschaften 1969.

BURROWS,B.A., F.PETERS, and F.C.LOWELL
Physical binding of insulin by gamma globulins of insulin-resistent subjects.
J.Clin.Invest. 36, 393-397 (1957).

CHAO,P.Y., J.H.KARAM, and G.M.GRODSKY
Insulin 131-I binding in serum of normal and diabetic subjects by ultracentrifugation and gel filtration.
Diabetes 14, 27-32 (1965).

CRAMER,F. Papierchromatographie. 2. Aufl.
Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie 1953.

DÜRR,H.K.
Zur Frage der Wechselwirkung zwischen Insulin und dem Alpha-2 Makroglobulin des Humanserums.
Inaug.Diss.Tübingen (1970).

DÜRR,H.K. und E.KALLEE
Spaltung von 131 J-Rinderinsulin durch reines α 2-Makroglobulin.
Z.Naturforsch. 22 b, 793-794 (1967).

FERREBEE,J.W., B.B.JOHNSON, J.C.MITHOEFER, and J.W.GARDELLA
Insulin and adrenocorticotropin labelled with radioiodine.
Endocrinology 48, 277-283 (1951).

FREUNDLICH,H. Kapillarchemie. Leipzig: 1930/1932.
Zit. n. R.BRDIČKA, 1969.

GJEDDE,F.
Insulin binding proteins in normal human serum. The in vitro association of homologous 125 I-labelled insulin in normal serum proteins.
Acta Physiol.Scand. 70, 69-79 (1967).

HILL, J.B.
The adsorption of 131 I-insulin to glass.
Endocrinology 65, 515-517 (1959).

JØRGENSEN,K.R.
Evaluation of the double antibody radioimmunoassay of insulin and the determination of insulin in plasma and urine in normal subjects.
Acta Endocrinol. (Kbh) 60, 327-351 (1969).

KALLEE,E.
Über 131J-signiertes Insulin.I.Mitteilung (Nachweis).
Z.Naturforsch. 7 b, 661-663 (1952).

KALLEE,E.
Über 131J-signiertes Insulin.II. Mitteilung (Anwendungsbereich und Grenzen der Nachweismethode).
Klin.Wschr. 32, 508-509 (1954).

KALLEE,E.
Die Bedeutung der Radioisotope für papierelektrophoretische und radioimmunologische Untersuchungen.
Ergebn.Labor.-Med. 3, 109-114 (1967).

KALLEE,E.
Die Inselzellhormone: Radiojodiertes Insulin.
In: "Handbuch des Diabetes mellitus". Band I.
S.247-255. Hrsg.E.F.PFEIFFER et al.
München: Lehmanns Verlag 1969.

KALLEE, E. und F.LOHSS
Diskussionsbemerkung zu H.MILLER und G.OWEN in "Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung"
Band 4, S.275. München: Urban & Schwarzenberg 1960.

KALLEE,E. und B.M.MÜLLER
Persönliche Mitteilung (1968).

KARLSON,P.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 4. Aufl.
Stuttgart: Thieme Verlag 1964.

KERP,L., S.STEINHILBER und H.KASEMIR
Ein Verfahren zum Nachweis insulinbindender Antikörper durch Differentialadsorption.
Klin.Wschr. 44, 560-567 (1966).

LAUG,E.P.
Retention of dichromate by glassware after exposure to potassium dichromate cleaning solution.
Ind.Eng.Chem.Anal.Ed. 6, 111-112 (1934).

MITCHELL,M.L.
Interaction of radioinsulin with serum proteins in vitro and with liver in vivo among diabetic and nondiabetic patients.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 20, 1001-1012 (1963).

MÜLLER,B.M.
Adsorption von Insulin verschiedener Species an Elektrophoresepapier.
Inaug.Diss.Tübingen (1969).

NEWERLY,K. and S.A.BERSON
Lack of specifity of insulin-131 I-binding by isolated rat diaphragm. Proc.Soc.Exper. Biol.Med. 94, 751-755 (1957).

PETERS,F., B.A.BURROWS, and F.C.LOWELL
Physical binding of gammaglobulins from insulin-resistant subjects.
Fed.Proc. (Abstract) 608 (1956).

REED,G.W. and R.E.ROSSALL
Radioactive tracer investigations on the adsorption of serum albumin on glass surfaces.
Radioisotopes in the Scientific Research 2,
London, New York, Paris: Pergamon Press 1958.

SÖNKSEN, P.H., J.P.ELLIS, C.LOWY, A.RUTHERFORD, and J.D.N.NABARRO
A quantitative evaluation of the relative efficiency of gelatine and albumin in preventing insulin adsorption to glass.
Diabetologia 1, 208-210 (1965).

STEIGERWALD,H., W.SPIELMANN, H.FRIES und S.F.GREBE
Neuere Untersuchungen über die Antigenwirkung des Insulins.
Klin.Wschr. 38, 973-980 (1960).

TISELIUS,A.
Some recent trends in biochemistry.
Chem.Engng.News 27, 1041-1044 (1949).

TSWETT,M.S.
Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode.
Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls.
Ber.Dtsch.Bot.Ges. 24, 384-393 (1906).

TURBA,F.
Chromatographische Methoden in der Proteinchemie einschließlich verwandter Methoden wie Gegenstromverteilung, Papierionophorese.
Berlin-Göttingen-Heidelberg:Springer Verlag 1954.

WISEMAN jr.,R. and B.E.BALTZ
Prevention of insulin 131 I-absorption to glass.
Endocrinology 68, 354-357 (1961).

Mein Dank gilt vor allem Herrn Professor Dr.E.Kallee,der mir das Thema überließ, mich freundlich und geduldig anleitete und mir in der Isotopenabteilung der Medizinischen Klinik großzügige Arbeitsmöglichkeiten gewährte.

Herr Professor Dr.E.Graf,Institut für Pharmazeutische Technologie derUniversität Tübingen,stellte mir dankenswerterweise die Zellulosetabletten zur Verfügung.

Dank schulde ich ferner Herrn Dr.B.Krause, Abteilung für Medizinische Physik der Radiologischen Klinik des Katharinenhospitals Stuttgart,für die Beratung bei der mathematisch-statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Herrn Dr.D.Geiseler,Hauptlabor der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen,verdanke ich wertvolle Ratschläge bei der Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 30. 11. 1944 wurde ich, Eberhard Fritz Egner, als Sohn des Verwaltungsbeamten Friedrich Egner und seiner Ehefrau Selma Franziska, geb. Schrempf, in Stuttgart geboren.

Die Schule besuchte ich von 1951 bis 1964 in Stuttgart. Am 26. 2. 1964 legte ich am dortigen Wilhelmsgymnasium die Reifeprüfung ab. Anschließend leistete ich die Wehrpflicht bei der Bundeswehr.

Vom Sommersemester 1965 bis zum Sommersemester 1970 war ich an der Universität Tübingen für das Fach Humanmedizin immatrikuliert. Ich habe im Oktober 1967 die ärztliche Vorprüfung und am 2. 2. 1971 die ärztliche Prüfung abgelegt.

Seit Ableistung der Medizinalassistentenzeit am Katharinenhospital der Stadt Stuttgart arbeite ich am dortigen Pathologischen Institut. Am 20. 10. 1977 habe ich die Facharztanerkennung als Pathologe erhalten.